

無題

1/7/1
DIALOG(R)File 350:Derwent WPIX
(c) 2006 The Thomson Corp. All rts. reserv.

016636516 **Image available**

WPI Acc No: 2004-795229/200478

Magnetic substance-incorporated particle for immunoassay, contains organic polymeric material, and dispersed magnetic substance of preset average particle diameter

Patent Assignee: SEKISUI CHEM CO LTD (SEKI); SEKISUI CHEM IND CO LTD (SEKI)

Inventor: KAWAGUCHI H; OKA T; OMOTO I; WAKUI W

Number of Countries: 109 Number of Patents: 004

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 200492732	A1	20041028	WO 2004JP5515	A	20040416	200478 B
JP 2004331953	A	20041125	JP 200496400	A	20040329	200478
JP 2005241547	A	20050908	JP 200454295	A	20040227	200559
EP 1617220	A1	20060118	EP 2004727432	A	20040416	200606
			WO 2004JP5515	A	20040416	

Priority Applications (No Type Date): JP 200454295 A 20040227; JP 2003111994 A 20030416; JP 2003360986 A 20031021

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

WO 200492732 A1 J 44 G01N-033/553

Designated States (National): AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BW BY BZ CA CH CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE EG ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NA NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW

Designated States (Regional): AT BE BG BW CH CY CZ DE DK EA EE ES FI FR GB GH GM GR HU IE IT KE LS LU MC MW MZ NL OA PL PT RO SD SE SI SK SL SZ TR TZ UG ZM ZW

JP 2004331953 A 11 C08L-025/08

JP 2005241547 A 12 G01N-033/545

EP 1617220 A1 E G01N-033/551 Based on patent WO 200492732

Designated States (Regional): AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IT LI LT LU LV MC MK NL PL PT RO SE SI SK TR

Abstract (Basic): WO 200492732 A1

NOVELTY - A magnetic substance-incorporated particle contains organic polymeric material, and magnetic substance of average particle diameter of 1-30 nm. The incorporated magnetic substance is in the dispersed state.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

(1) manufacture of the magnetic substance-incorporated particle, which involves polymerizing monomer having hydrophilic group and/or monomer which does not have hydrophilic group in aqueous medium, oxidizing metal ion, and incorporating magnetic substance of oxidized metal ion into particle;

(2) particle for immunoassay, which is formed by adsorbing or coupling antigen or antibody with the magnetic substance-incorporated particle; and

(3) immunoassay, which involves using the magnetic substance-incorporated particle or particle for immunoassay.

USE - For particles for immunoassay (claimed).

ADVANTAGE - The magnetic substance-incorporated particle has excellent dispersion stability and narrow particle size distribution, and enables accurate measurement with favorable sensitivity.

pp; 44 DwgNo 0/1

Derwent Class: A13; A14; A89; B04; D16; J04; S03

International Patent Class (Main): C08L-025/08; G01N-033/545; G01N-033/551; G01N-033/553

International Patent Class (Additional): A61K-041/00; A61K-047/02;

A61K-047/30; A61K-049/00; C08K-003/22; G01N-033/543; G01N-033/547;

H01F-001/26

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-331953

(P2004-331953A)

(43) 公開日 平成16年11月25日(2004.11.25)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C08L 25/08	C08L 25/08	4C076
A61K 41/00	A61K 41/00	4C084
A61K 47/02	A61K 47/02	4C085
A61K 47/30	A61K 47/30	4J002
A61K 49/00	A61K 49/00	5E041
審査請求 未請求 請求項の数 11 O L		(全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-96400 (P2004-96400)
(22) 出願日 平成16年3月29日 (2004.3.29)
(31) 優先権主張番号 特願2003-111994 (P2003-111994)
(32) 優先日 平成15年4月16日 (2003.4.16)
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 000002174
積水化学工業株式会社
大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号
(72) 発明者 岡 孝之
大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学
工業株式会社内
(72) 発明者 大本 泉
大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学
工業株式会社内
Fターム(参考) 4C076 AA29 AA41 EE02 EE23 FF70
4C084 AA11 CA59 MA43 NA20 ZC78
4C085 AA19 HH20 JJ11 KA28 KB08
4J002 BC041 BC071 BG071 DE116 FA086
GB04 HA09
5E041 BC05 HB14 NN06

(54) 【発明の名称】 磁性体内包粒子、免疫測定用粒子及び免疫測定法

(57) 【要約】

【課題】 均一な磁性を有し、分散安定性に優れ、粒径分布の狭い磁性体内包粒子及びそれを用いる免疫測定用粒子、並びにそれら磁性体内包粒子又は免疫測定用粒子を用いる免疫測定法を提供する。

【解決手段】 スチレン系モノマーに由来するモノマー単位とグリシジル基含有モノマーに由来するモノマー単位とを含有する共重合体を主構成成分とする有機高分子物質、及び、磁性体からなる磁性体内包粒子であって、粒子内部に平均粒径1～30nmの磁性体を分散状態で0.1～50重量%含有している磁性体内包粒子。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

スチレン系モノマーに由来するモノマー単位とグリシジル基含有モノマーに由来するモノマー単位とを含有する共重合体を主構成成分とする有機高分子物質、及び、磁性体からなる磁性体内包粒子であって、

粒子内部に平均粒径1～30nmの磁性体を分散状態で0.1～50重量%含有していることを特徴とする磁性体内包粒子。

【請求項2】

有機高分子物質中のスチレン系モノマーに由来するモノマー単位の比率が、5～90重量%であることを特徴とする請求項1記載の磁性体内包粒子。

10

【請求項3】

有機高分子物質は、架橋されていることを特徴とする請求項1又は2記載の磁性体内包粒子。

【請求項4】

平均粒径が0.05～0.5 μ mであることを特徴とする請求項1、2又は3記載の磁性体内包粒子。

【請求項5】

粒子表面に、カルボキシル基、水酸基、エポキシ基、アミノ基、トリエチルアンモニウム基、ジメチルアミノ基及びスルホン酸基よりなる群より選ばれる少なくとも1種の官能基を有することを特徴とする請求項1、2、3又は4記載の磁性体内包粒子。

20

【請求項6】

粒子表面に抗原又は抗体と共有結合可能な官能基を有するリンカーが結合していることを特徴とする請求項1、2、3、4又は5記載の磁性体内包粒子。

【請求項7】

抗原又は抗体と共有結合可能な官能基は、エポキシ基であることを特徴とする請求項6記載の磁性体内包粒子。

【請求項8】

リンカーは、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテルであることを特徴とする請求項6又は7記載の磁性体内包粒子。

【請求項9】

請求項1、2、3、4、5、6、7又は8記載の磁性体内包粒子に、抗原又は抗体が結合していることを特徴とする免疫測定用粒子。

30

【請求項10】

請求項1、2、3、4、5、6、7又は8記載の磁性体内包粒子又は請求項9記載の免疫測定用粒子を用いることを特徴とする免疫測定法。

【請求項11】

請求項1、2、3、4、5、6、7又は8記載の磁性体内包粒子を標識として用いることを特徴とする免疫測定法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、磁性体を内包する磁性体内包粒子及びそれを用いる免疫測定用粒子、並びにそれら磁性体内包粒子又は免疫測定用粒子を用いる免疫測定法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、磁性体含有高分子粒子の作製法として(1)作製済みの高分子粒子に鉄イオンを含ませて磁性体を作製する方法、(2)モノマーから高分子粒子を重合する過程で作製済みの磁性体粒子を含ませる方法(特許文献1参照)、(3)別々に作製した高分子粒子と磁性体粒子とを複合化させる方法(特許文献2参照)が知られている。また、この他、(4)磁性体粒子を高分子等で被覆する方法(特許文献3参照)がある。

50

【 0 0 0 3 】

(1) の方法は鉄イオンを高分子粒子に吸収させるため、表面に磁性体が露出し、磁性体が酸化するという課題があった。また (2) の方法は磁性体粒子が均一に高分子粒子に取り込まれないという課題や、粒径の制御が困難で粒径分布の広い物となるという課題があった。また、(3) の方法は高分子粒子が凝集するため、粒径の小さな粒子には使用できないという課題がある。また、(4) の方法は、被覆が均一にできないため、浮遊性や分散性が悪く、また、磁性体粒子表面の一部が露出する場合があった。

【 0 0 0 4 】

一方、微量免疫測定法としては、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ等が従来から知られており、既に実用化されている。これらの方法は、それぞれアイソトープ、酵素、蛍光物質を標識として付加した抗原又は抗体を用い、これと特異的に反応する抗体又は抗原の有無を検出する方法である。このような免疫測定法に際して、磁性体内包粒子は、効率よくかつ簡便に B / F 分離を行うために用いられている。また、B / F 分離以外の使用 (特許文献 4 参照) や、磁性体内包粒子自体を標識材料とする免疫測定法 (特許文献 5 、特許文献 6 、特許文献 7 参照) が開示されている。

【 0 0 0 5 】

【特許文献 1】特開平 9 - 2 0 8 7 8 8 号公報

【特許文献 2】特開平 6 - 2 3 1 9 5 7 号公報

【特許文献 3】特開平 6 - 9 2 6 4 0 号公報

【特許文献 4】特開 2 0 0 0 - 8 8 8 5 2 号公報

【特許文献 5】特開平 6 - 1 4 8 1 8 9 号公報

【特許文献 6】特開平 7 - 2 2 5 2 3 3 号公報

【特許文献 7】特表 2 0 0 1 - 5 2 4 6 7 5 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 6 】

本発明は、上記課題に鑑み、均一な磁性を有し、分散安定性に優れ、粒径分布の狭い磁性体内包粒子及びそれを用いる免疫測定用粒子、並びにそれら磁性体内包粒子又は免疫測定用粒子を用いる免疫測定法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

本発明は、スチレン系モノマーに由来するモノマー単位とグリシジル基含有モノマーに由来するモノマー単位とを含有する共重合体を主構成成分とする有機高分子物質、及び、磁性体からなる磁性体内包粒子であって、粒子内部に平均粒径 1 ~ 3 0 n m の磁性体を分散状態で 0 . 1 ~ 5 0 重量 % 含有している磁性体内包粒子である。

以下に本発明を詳述する。

【 0 0 0 8 】

本発明の磁性体内包粒子は、磁性体が粒子表面に露出することなく、粒子内部に分散した状態で存在している。より詳しくは、磁性体の前駆体である金属イオン、金属イオンとの親和性を持ちつつ粒子のコアを形成するためのスチレン系モノマーとグリシジル基含有モノマーからなる疎水性モノマー混合物、及び、水中で安定に分散する高分子粒子を形成しつつ粒子のシェルを構成するための親水性モノマーを合わせて重合を行ない、その重合による粒子生成と磁性体生成を同時進行させることにより、磁性体を粒子内に内包した磁性体内包粒子を調製する。本発明の磁性体内包粒子に内包される磁性体は、平均粒径 1 ~ 3 0 n m の均一な大きさで、磁性体内包粒子内部に均一に分散した状態で内包されている。本発明の磁性体内包粒子に占める磁性体の割合は、0 . 1 ~ 5 0 重量 % である。

【 0 0 0 9 】

本発明の磁性体内包粒子を構成する有機高分子物質は、スチレン系モノマーに由来するモノマー単位とグリシジル基含有モノマーに由来するモノマー単位とを含有する共重合体を主構成成分とする。

上記スチレン系モノマーとしては、例えば、スチレン、 α -メチルスチレン、 p -メチルスチレン、 p -クロロスチレン、クロロメチルスチレン等が挙げられる。これらスチレン系モノマーは単独で用いてもよく、2種以上を併用しても良い。

【 0 0 1 0 】

上記有機高分子物質中のスチレン系モノマーに由来するモノマー単位の比率は5～90重量%である。スチレン系モノマーに由来するモノマー単位の比率が5重量%未満であると、水中での分散安定性が低くなり、重合中に自己凝集し易くなる。また、スチレン系モノマーに由来するモノマー単位の比率が90重量%を超えると、磁性体の前駆体である金属イオンとの親和性が低くなり、粒子内に形成する磁性体が少なくなる。

【 0 0 1 1 】

10

上記グリシジル基含有モノマーとしては、例えば、グリシジルメタクリレート、グリシジルアクリレート等のグリシジル基を含有するビニル化合物が挙げられる。

【 0 0 1 2 】

上記グリシジル基含有モノマーは、重合による粒子形成とマグネタイト等の磁性体の生成を同時進行させる際に、粒子重合中に高濃度に金属イオンを取り込む能力に優れている。上記で例示したグリシジル基含有モノマーの中でも、特にグリシジルメタクリレートは鉄イオン及びマグネタイトとの親和性が高いため好適に使用される。

【 0 0 1 3 】

また、上記スチレン系モノマー及びグリシジル基含有モノマーに他の疎水性モノマーを共重合することができる。上記他の疎水性モノマーとしては、例えば、塩化ビニル；酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル等のビニルエステル類；アクリロニトリル等の不飽和ニトリル類；メチル（メタ）アクリレート、エチル（メタ）アクリレート、ブチル（メタ）アクリレート、2-エチルヘキシル（メタ）アクリレート、ステアシル（メタ）アクリレート、エチレングリコール（メタ）アクリレート、トリフルオロエチル（メタ）アクリレート、ペンタフルオロプロピル（メタ）アクリレート、シクロヘキシル（メタ）アクリレート、グリシジルメタクリレート、テトラヒドロフルフリル（メタ）アクリレート等のアクリル系モノマー等が挙げられる。これら他の疎水性モノマーは単独で用いてもよく、2種以上を併用しても良い。

20

【 0 0 1 4 】

また、用途によっては架橋性モノマーを使用して、上記有機高分子物質が架橋されているもよい。上記架橋性モノマーとしては、例えば、ジビニルベンゼン、ジビニルピフェニル、ジビニルナフタレン、エチレングリコールジ（メタ）アクリレート、1,6-ヘキサジオールジ（メタ）アクリレート、ネオペンチルグリコールジ（メタ）アクリレート、トリメチロールプロパントリ（メタ）アクリレート、テトラメチロールメタントリ（メタ）アクリレート、テトラメチロールプロパントラ（メタ）アクリレート、ジアリルフタレート及びその異性体、トリアリルイソシアヌレート及びその誘導体等が挙げられる。これら架橋性モノマーは単独で用いてもよく、2種以上を併用しても良い。これらの中でも、エチレングリコールジメタアクリレートは鉄イオン及びマグネタイトとの親和性が高いため好適に使用される。

30

【 0 0 1 5 】

上記親水性モノマーとしては、アクリル酸、メタクリル酸、イタコン酸、フマル酸、マレイン酸等の重合性不飽和結合を有するカルボン酸；重合性不飽和結合を有するリン酸エステル；重合性不飽和結合を有するスルホン酸エステル；ジメチルアミノエチルメタクリレート4級塩、ジエチルアミノエチルメタクリレート4級塩等のアクリロイル基を有するアミンの塩や、ビニルピリジン等のビニル基を有する含窒素化合物の塩等のカチオン基を有するビニル系モノマー；2-ヒドロキシエチルメタクリレート、ポリエチレングリコール（メタ）アクリレート、（メタ）アクリルアミド、メチロールアクリルアミド、グリセロールメタクリレート等の非イオン性ビニル系モノマーが挙げられる。これら親水性モノマーは、単独で用いてもよく、2種以上を併用しても良い。

40

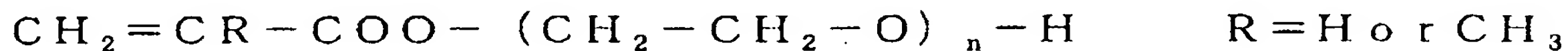
【 0 0 1 6 】

50

これらの親水性モノマーのなかでも、下記一般式で表されるポリエチレングリコール（メタ）アクリレートは、水中で粒子を安定に分散する能力が高く、磁性体の生成を妨げないので好適に使用される。下記一般式の n は 1 ～ 20、好ましくは、2 ～ 10 である。

【 0 0 1 7 】

【 化 1 】



【 0 0 1 8 】

上記金属イオンは磁性体を形成するものであれば特に限定されないが、好ましくは、鉄イオン、コバルトイオン、ニッケルイオンである。より好ましくは、鉄イオンである。

【 0 0 1 9 】

磁性体であるマグネタイトは塩化第 2 鉄を酸化剤等で酸化して得られる。重合開始剤により、上述のモノマーの重合を開始するとともに 2 価の鉄イオンの酸化（マグネタイト化）を行うことにより磁性体（マグネタイト）内包粒子が調製される。

【 0 0 2 0 】

上記重合開始剤としては特に限定されず、例えば、水溶性の有機アゾ化合物、無機過酸化物、有機過酸化物等が挙げられる。

上記重合開始剤の好適な例としては、過硫酸カリウム（以下「KPS」と記す；重合温度 70℃）、アゾビスアミジノプロパン塩酸塩（重合温度 70℃）、2, 2-アゾビス[2-（2-イミダゾリン-2-イル）プロパン]ジハイドロクロライド（重合温度 60℃）が挙げられる。このうち過酸化物系重合開始剤である KPS は、重合開始とともに 2 価の鉄イオンの酸化に寄与することが期待され、KPS を用いた場合は、モノマーと鉄イオンによる重合とマグネタイト生成とが同時に進行することが想定される。アゾビスアミジノプロパン塩酸塩及び 2, 2-アゾビス[2-（2-イミダゾリン-2-イル）プロパン]ジハイドロクロライドは酸化力が弱く、2 価の鉄イオンの緩やかな酸化反応に関与する重合開始剤となる。なお、アゾビスアミジノプロパン塩酸塩としては、商品名「V-50」（和光純薬工業社製）が、2, 2-アゾビス[2-（2-イミダゾリン-2-イル）プロパン]ジハイドロクロライドとしては、商品名「VA-044」（和光純薬工業社製）が市販されている。

【 0 0 2 1 】

上記重合開始剤は、 Fe^{2+} の酸化により消費されたり、 Fe^{3+} によってラジカル活性を失う場合があるため、粒子成長を促す目的で、粒子成長過程に後添加することが有効である。この場合、新たな 2 次粒子は形成されず、粒子表面がポリマーで被覆される。

【 0 0 2 2 】

本発明において、重合と同時にマグネタイトを作製するためには、重合系内の pH は塩基性に調整される。上記重合開始剤として KPS を用いた系では、水中での分散安定性がよく粒径分布の狭い単分散粒子が得られるというメリットがあるが、酸化力の制御ができず重合系内が酸性になるために磁石への引き寄せられ方の弱い粒子になるというデメリットがある。一方、上記重合開始剤として酸化力を持たない 2, 2-アゾビス[2-（2-イミダゾリン-2-イル）プロパン]ジハイドロクロライドを用いた系では、重合系内の pH がほぼ中性であるというメリットがある。

【 0 0 2 3 】

重合系内の pH を弱塩基性に保つには、一般的な塩基を使用することができる。

好ましくは NH_4OH が pH 調整剤として使用される。上記 pH 調整剤は、必要に応じて数回添加することができる。

【 0 0 2 4 】

また、本発明の磁性体内包粒子は、必要に応じて、粒子表面にカルボキシル基、水酸基、エポキシ基、アミノ基、トリエチルアンモニウム基、ジメチルアミノ基、スルホン酸基等の官能基を有していてもよい。これらの官能基を介して抗原や抗体と共有結合を行うこと

ができる。

【 0 0 2 5 】

上記官能基は、各々の官能基を有するモノマーを重合用モノマー混合物に予め配合するか、又は、重合途中に添加することにより磁性体内包粒子の表面に導入することができる。上記官能基を有するモノマーとしては、例えば、カルボキシル基としては（メタ）アクリル酸、水酸基としては2-ヒドロキシエチル（メタ）アクリレート、エポキシ基としてはグリシジル（メタ）アクリレート、トリエチルアンモニウム基としてはトリエチルアンモニウム（メタ）アクリレート、ジメチルアミノ基としてはジメチルアミノ（メタ）アクリレート等が挙げられる。

【 0 0 2 6 】

本発明の磁性体内包粒子は、必要に応じて粒子表面に抗原又は抗体と共有結合可能な官能基を有するリンカーが結合していてもよい。

本発明におけるリンカーとは、上記磁性体内包粒子と抗原、抗体等の化合物との間に存在する化学物質である。上記リンカーは、立体障害が起こらないような長さで、かつ、非特異的吸着が生じにくい化合物であり、磁性体内包粒子及び抗原、抗体等の化合物と結合する前は、その分子末端に、例えば、アミノ基、カルボキシル基、エポキシ基、トシル基、チオール基等の抗原又は抗体と共有結合可能な官能基を有していることが好ましい。本発明におけるリンカーとしては、粒子表面のグリシジル基含有モノマー由来のエポキシ基、又は、エポキシ基の開環により生じる水酸基、アミノ基等と抗原、抗体等を適当な距離をおいて結合し得るものであれば特に限定されない。好ましくは、エポキシ基を複数末端に有する化合物、例えば、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリプロピレングリコールジグリシジルエーテル、ネオペンチルグリコールジグリシジルエーテル、トリメチロールプロパンポリグリシジルエーテル等が挙げられる。より好ましくは、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテルである。

このようなリンカーを磁性体内包粒子に導入することにより、例えば、磁性体内包粒子に結合する抗原、抗体、試薬等の反応性を上げることが可能となり、即ち感度良く精密な測定が可能となり、また、磁性体内包粒子の粒子表面がタンパク質に対して非吸着性のものであっても、リンカーがタンパク質との結合性を有するので、抗原又は抗体を磁性体内包粒子に確実に結合させることが可能となる。

【 0 0 2 7 】

本発明の磁性体内包粒子は、懸濁重合、分散重合、乳化重合、ソープフリー乳化重合等の粒子重合法により製造できるが、最終的に得られる磁性体内包粒子のCv値は5%以下であることが好ましいので、粒径分布の制御に優れたソープフリー乳化重合により好適に製造される。

【 0 0 2 8 】

以下、ソープフリー乳化重合による磁性体内包粒子の作製方法を例示するが、この方法に限定されるものではない。

代表的な重合組成は、

疎水性モノマー及び親水性モノマーを含有する混合モノマー組成物： 3 g

H₂O： 1 0 0 g

からなる。四つ口フラスコに上記モノマー組成物及び水を秤量する。それぞれの口には攪拌棒、還流冷却管を取り付ける。次に、系を恒温槽に入れ、攪拌しながら系内を窒素置換する。恒温槽は、添加する重合開始剤の重合温度に調整するのが好ましく、例えば、重合開始剤としてKPS又はアソビスアミジノプロパン塩酸塩を用いる場合は70℃とするのが好ましく、重合開始剤として2, 2-アソビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]ジハイドロクロライドを用いる場合は50～60℃とするのが好ましい。その後、水に溶かした重合開始剤を注射筒で系内に注入する。この時点を重合開始とし、所定時間後に注射筒を用いて磁性源となるFeCl₂・4H₂Oの水溶液を注入する。FeCl₂・4H₂Oは重合開始剤の1/3～4倍モルを水5gに溶かしたものを使用する。即ち、重合開始剤により上述のモノマーの重合を開始するとともに2価の鉄イオンの酸化（

マグネタイト化)を行うことにより粒子を製造する。

重合は開始から2時間～24時間行うことが好ましい。適度な酸化力を得るために、重合途中にNH₂OHを加えてもよく、更に、重合による粒子の成長を促すために、重合途中に重合開始剤を加えてもよい。この様にして磁性体を分散状態で含有する有機高分子物質からなる粒子を得ることができる。

【0029】

作製した粒子を、残存モノマー・重合開始剤、未反応の鉄イオンを取り除くために遠心分離・再分散を蒸留水で繰り返し行い精製することにより、本発明の磁性体内包粒子が得られる。遠心分離を行った後、上澄みをデカンテーションにより捨て、蒸留水を加え、ガラス棒により再分散を行う。精製後の磁性体内包粒子は、ガラス製バイアルに移され、ふた・パラフィルムで密閉・保存される。

10

【0030】

作製した磁性体内包粒子へのリンカーの導入は、例えば、磁性体内包粒子をアルカリ性水溶液中に分散し、続いて、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテルを加えて、24時間混合することによりなし得る。

【0031】

本発明の磁性体内包粒子の平均粒径は、重合条件により調整することができるが、0.05～0.5μmであるのが好ましい。0.05μm未満であると、凝集しやすくなり、分散安定性が低下し、0.5μmを超えると、例えば、磁性体内包粒子を懸濁液中で使用する場合は、磁性体内包粒子が沈殿し易くなり、また、イムノクロマトのように磁性体内包粒子を多孔性担体中で使用する場合は、多孔性担体中で磁性体内包粒子が移動しにくくなるなど、試薬としての取扱性が低下する。

20

また、本発明の磁性体内包粒子に内包される磁性体の平均粒径は、1～30nmであり、その含有量は、0.1～50重量%である。平均粒径が1nm未満であると、磁性体及び磁性体内包粒子の磁気応答特性が減少し、測定感度が低下し、30nmを超えると、磁性体内包粒子内での分散性が低下する。一方、含有量が0.1重量%未満であると、磁性体及び磁性体内包粒子の磁気応答特性が減少し、測定感度が低下し、50重量%を超えると、磁性体内包粒子の重合操作性が低下する。好ましい含有量は0.1～40重量%であり、重合組成により調整することができる。

【0032】

上述のようにして得られた本発明の磁性体内包粒子に抗原又は抗体を吸着又は結合させることにより免疫測定用粒子を得ることができる。抗体又は抗原を磁性体内包粒子に吸着又は結合させる方法としては、物理吸着法やカルボジイミドを用いた化学結合法等公知の方法が使用することができる。本発明の磁性体内包粒子の粒子表面にエポキシ基を有するリンカーが導入されている場合は、リンカーを介して抗原又は抗体のアミノ基やチオール基等と化学結合させて、免疫測定用粒子を作製することができる。このような本発明の磁性体内包粒子に抗原又は抗体が結合している免疫測定用粒子もまた、本発明の1つである。

30

【0033】

本発明の磁性体内包粒子や免疫測定用粒子は免疫測定法に用いることができる。本発明の磁性体内包粒子や免疫測定用粒子を用いる免疫測定法もまた、本発明の1つである。

40

本発明の免疫測定法としては、磁性体内包粒子を担体として用いたラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ等公知の方法が挙げられ、サンドイッチ法や競合法により、目的とする抗原又は抗体を測定することができる。また、上記方法の標識物質であるアイソトープ、酵素等の代わりに、磁性体内包粒子を標識として用いることができる。本発明の磁性体内包粒子は磁性体を均一に分散含有する粒径分布の狭い粒子であるため、免疫測定法において標識として用いることにより感度よく精密な測定を行うことができる。

【発明の効果】

【0034】

本発明によれば、疎水性モノマーと親水性モノマーとを共重合して粒子を形成する反応と、粒子内に金属イオンを取り込ませながら金属イオンを変性して磁性体を形成する反応を

50

同時に行うことにより、均一な磁性を有し、かつ、粒径分布の狭い磁性体内包粒子を得ることができる。本発明の磁性体内包粒子に抗原又は抗体を吸着又は結合させることにより本発明の免疫測定用粒子を得ることができる。また、この磁性体内包粒子又は免疫測定用粒子を用いて免疫測定法を行うことにより、感度良く精密な測定が可能になる。更に、この磁性体を含む磁性体内包粒子を標識として免疫測定法を行うことにより、感度よく精密な測定が可能になる。

また、磁性体内包粒子にリンカーが結合している場合には、例えば、磁性体内包粒子に結合する抗原、抗体、試薬等の反応性を上げることが可能となり、即ち感度良く精密な測定が可能となり、また、磁性体内包粒子の粒子表面がタンパク質に対して非吸着性のものであっても、リンカーがタンパク質との結合性を有するので、抗原又は抗体を磁性体内包粒子に確実に結合させることが可能となる。 10

【発明を実施するための最良の形態】

【0035】

以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

【0036】

(実施例1)

200 mL の四つ口フラスコにスチレン 3.0 g、グリシジルメタクリレート 3.0 g、ポリエチレングリコールメタクリレート 0.3 g、エチレングリコールジメタクリレート 0.03 g 及び水 200 g を秤量した。それぞれの口には攪拌シールと攪拌棒、還流冷却管、セラムラバーを取り付けた。系を 70℃ の恒温槽に入れ、200 rpm で攪拌しながら系内を 30 分間窒素置換した。その後、水に溶かした重合開始剤である KPS 0.1 g を 2.0 g の水に溶解し注射筒で系内に注入した。この時点を重合開始時とし、2 分後に注射筒を用いて FeCl₂・4H₂O 水溶液 (0.2 g / 20 mL) を注入した。重合は重合開始から 20 時間行った。適度な酸化力を得るために、重合途中に NH₄OH 0.4 g を加えた。 20

【0037】

作製した粒子は、遠心分離・再分散を蒸留水で 4 回繰り返し行うことで精製した。この際、遠心分離は 20℃、13500 rpm で行った。遠心分離を行った後、上澄みをデカンテーションにより捨て、蒸留水を加え、ガラス棒により再分散を行って磁性体内包粒子を得た。 30

【0038】

(実施例2)

スチレン 2.0 g、グリシジルメタクリレート 4.0 g に変更したこと以外は実施例 1 と同様に磁性体内包粒子を作製した。

【0039】

(実施例3)

スチレン 4.0 g、グリシジルメタクリレート 1.0 g に変更したこと以外は実施例 1 と同様に磁性体内包粒子を作製した。

【0040】

(実施例4)

実施例 1 で作製した磁性体内包粒子 1.0 g を 10% アンモニア水 50 mL に投入し、70℃ で 20 時間攪拌した。次いで、イオン交換水を用いて遠心洗浄を 3 回行ない、50 mL のイオン交換水に分散させた。続いて、エチレングリコールジグリシジルエーテル 30 g を添加混合し、水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 11 に調整した後、室温で 24 時間攪拌した。反応後、イオン交換水を用いて遠心洗浄を 3 回行ない、エポキシ基を有するリンカーが結合した磁性体内包粒子を得た。

【0041】

(比較例1)

200 mL の四つ口フラスコにグリシジルメタクリレート 6.0 g、ポリエチレングリコ 50

ールメタクリレート 0.3 g、エチレングリコールジメタクリレート 0.03 g 及び水 200 g を秤量したこと以外は、実施例 1 と同様に磁性体内包粒子を作製した。

【 0 0 4 2 】

(比較例 2)

200 mL の四つ口フラスコにスチレン 6.0 g、ポリエチレングリコールメタクリレート 0.3 g、エチレングリコールジメタクリレート 0.03 g 及び水 200 g を秤量したこと以外は、実施例 1 と同様に磁性体内包粒子を作製した。

【 0 0 4 3 】

得られた磁性体内包粒子分散液については、目視で粒子の分散状態を観察した。また、精製した磁性体内包粒子を水で希釈し、金属メッシュで支持したコロジオン膜上に沈着固定して、透過型電子顕微鏡 (TEM) により、粒子の形態を観察した。 10

【 0 0 4 4 】

実施例 1、2、3 及び 4 では、いずれも分散安定性の高い磁性体内包粒子が得られた。一方、比較例 1 では、凝集塊が認められ、得られた磁性体内包粒子は時間が経つにつれて沈降する分散安定性の低いものであった。また、比較例 2 では重合中に凝集が生じた。

【 0 0 4 5 】

TEM で観察された磁性体内包粒子の平均粒径と磁性体の大きさを表 1 に示す。なお、比較例 2 は凝集塊を除去後、超音波処理により分散した粒子を用いた。

【 0 0 4 6 】

【 表 1 】

20

	平均粒径 (nm)	
	磁性体内包粒子	磁性体
実施例 1	230	5
実施例 2	190	6
実施例 3	320	4
実施例 4	230	5
比較例 1	210	6
比較例 2	260	—

【 0 0 4 7 】

表 1 より、実施例 1、2、3 及び 4 で得られた磁性体内包粒子は、いずれも均一粒径の球形粒子で、磁性体を内包していることが観察された。一方、比較例 1 で得られた磁性体内包粒子は、形状が異形であった。また、比較例 2 では、磁性体が粒子内部にほとんど存在せずに、粒子表面に付着している様子が観察された。 30

【 0 0 4 8 】

作製した磁性体内包粒子 (実施例 1、2、3 及び 4) が、磁石へ引き寄せられることを確認するために、1.5 mL のマイクロチューブに試料を少量取り、蒸留水で適当に希釈して磁石つきマイクロチューブ立て (DYNAL 社製、MPC (登録商標) -M) にチューブを立てて、分散している磁性体内包粒子が磁石に引き寄せられることを視覚により確認した。

【 0 0 4 9 】

40

(免疫測定用粒子の作製)

実施例 4 で作製した磁性体内包粒子 12 mg に 0.1 M ホウ酸バッファを 1 mL 加え、15000 rpm にて 10 分間遠心分離を行ない、上清を除去した。得られた沈渣に、0.1 M ホウ酸バッファを 380 μ L、抗 α -hCG モノクローナル抗体溶液 (5.0 mg/mL) を 20 μ L 加え、充分混和して、室温にて 20 時間攪拌した。反応液は、15000 rpm にて 10 分間遠心分離を行ない、未反応の抗 α -hCG モノクローナル抗体を除去した。なお、磁性体内包粒子への抗 α -hCG モノクローナル抗体結合量は、上清の蛋白濃度測定から仕込みの 55% であることを確認した。得られた沈渣は 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 1 mL に懸濁させ、遠心分離を行った。その沈渣を 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) に牛血清アルブミンを 5% (W/V) の濃度になるように溶 50

解した溶液 900 μ l に懸濁させ、37℃で1時間攪拌し、ブロッキング処理を行った。その後、15000 rpmにて20分間遠心分離を行ない、沈渣に0.1 Mホウ酸バッファー 1 mMを添加し、超音波で分散させた。続いて、100 mMリン酸緩衝液 (pH 7.5) に牛血清アルブミン及びグリセロールを各々5% (W/V) の濃度になるように溶解し、更にアジ化ナトリウムを0.01% (W/V) の濃度になるように溶解した溶液 1 ml に懸濁させ、免疫測定用粒子を得た。

【産業上の利用可能性】

【0050】

本発明は、上述の構成よりなるので、均一な磁性を有し、分散安定性に優れ、粒径分布の狭い磁性体内包粒子及びそれを用いる免疫測定用粒子、並びにそれら磁性体内包粒子又は 10 免疫測定用粒子を用いる免疫測定法を提供することができる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.

F I

テーマコード (参考)

C 0 8 K 3/22

C 0 8 K 3/22

G 0 1 N 33/543

G 0 1 N 33/543 5 4 1 A

H 0 1 F 1/26

H 0 1 F 1/26